

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08621

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症に付随する認知障害におけるトリプトファン代謝の役割の解明

研究課題名(英文) The study for the role of tryptophan metabolism in diabetic nephropathy-associated cognitive disorder

研究代表者

深澤 元晶 (Fukasawa, Motoaki)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：70387728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病に伴う腎不全患者で広く見られる脳機能障害の原因として、脳内の炎症さらには統合失調症や認知症などに関与するキヌレニン代謝系との因果関係を検討した。糖尿病モデルラット(DM)と糖尿病性腎症モデルラット(DN)を比較すると、DN群の脳内でキヌレニン代謝物の増加は見られなかった。一方、DN群では脳脊髄液の組成がDM群と大きく異なり、さらに脳脊髄液の産生部位である脈絡叢の透過性が低下していた。また、DN群ではDM群に比較してうつ様行動や不安様行動の増加傾向が見られた。これらから、DN群では脈絡叢の血液脳脊髄液関門の透過性が低下した結果、脳内微小環境が変化し、行動が変容することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病に伴う腎不全患者で広く見られる脳機能障害は、血中の尿毒素が脳内に移行して脳機能を阻害することで進行すると考えられてきた。血液中の尿毒素が脳組織中へ移行する経路の一つとして、脳脊髄液を介する経路がある。本研究では、糖尿病性腎症において脳脊髄液を産生する脈絡叢の透過性が低下し、脳脊髄液の組成が変化した結果、脳組織の環境が変化して脳機能に影響する可能性が示唆された。今後、脈絡叢の透過性が変化する腎臓由来物質の動態を解析することにより、糖尿病性腎症に付随する脳機能障害の病態形成過程の解明が進展すると考えられる。本研究は、この脳機能障害の治療の標的として脈絡叢の透過性に焦点を当てる基盤となる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the causal relationship between brain dysfunction of diabetes-related renal failure and kynurenine metabolites which cause inflammation in the brain and are involved in schizophrenia and dementia. Comparing diabetic model rats (DM) and diabetic nephropathy model rats (DN), no increase in kynurenine metabolic system was observed in the brain of the DN group. On the other hand, the composition of cerebrospinal fluid in the DN group differed significantly from that in the DM group, and furthermore, the permeability of the choroid plexus, the site of cerebrospinal fluid production, was reduced. In addition, the DN group showed an increased tendency toward depression-like and anxiety-like behaviors compared to the DM group. These results suggest that the reduced permeability of the blood-cerebrospinal fluid barrier in the choroid plexus leads to changes in the brain microenvironment and further behavioral changes in diabetic nephropathy.

研究分野：神経科学

キーワード：脳脊髄液 脈絡叢の透過性 糖尿病性腎症 尿毒素

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性腎臓病と認知機能障害

慢性腎臓病の一つである糖尿病性腎症は糖尿病の合併症であり、2017年における透析患者の最多の原疾患である(全慢性透析患者約32万人の39%、全透析導入患者約4万人の43%) (日本透析医学会、「わが国の慢性透析療法の現況」2017年)。糖尿病性腎症の患者数は高齢化の進行に伴い増加の一途をたどっており、喫緊の対策が必要である。

慢性腎臓病は認知機能障害のリスク因子であり、遂行力低下を特徴とする脳血管性認知症の発症リスクが高いことが知られている。具体的には高齢、高血圧、糖尿病、酸化ストレスなど主に血管性因子である[1]。国内では、慢性腎臓病と認知症の発症について久山町研究において検討されており、腎機能の悪化とともに認知症発症率の増加が見られた[2]。

糖尿病性腎症患者においては、慢性腎不全の進行に伴い、臨床的知見として易怒性などの感情の激化がしばしば経験される。これは治療継続を困難にさせ、患者の死亡率上昇を招く。易怒性は何らかの不安やストレスの現れであると考えられ、アルツハイマー病の初期段階や軽度認知障害の患者の約3割に見られる症状である[3]。この原因の一部は脳血管障害によると思われるものの、糖尿病性腎症に特異的な変化が生じている可能性もある。

(2) 糖尿病性腎症とトリプトファン代謝系

近年、糖尿病患者の血中においてトリプトファン濃度が低下する一方、その代謝物でありストレスと関連するキヌレニン系代謝物の濃度が上昇しており[4][5]、糖尿病性腎症の進行予測マーカーとなることが示された[6]。また、統合失調症[7]、アルツハイマー病[8]やうつ病[9]の患者の脳内におけるキヌレニン代謝物の増加が報告されている。さらにキヌレニン系代謝物は脳内で炎症に伴い増加し、認知機能障害に関与することが実験動物で示された[10]。しかしながら、糖尿病性腎症とトリプトファン代謝に焦点を置いて認知機能障害を検討した事例は報告されていない。これらの知見から、「糖尿病性腎症における認知機能障害の原因はキヌレニン代謝異常である」という仮説を着想した。

2. 研究の目的

本研究は、糖尿病性腎症における腎機能、認知機能、トリプトファン代謝の関係性の解明を目的とした。本研究の特徴として、脳脊髄液及び脳細胞外液を同一個体で経時的に観察可能なため、腎機能障害の進行に伴う代謝の変化をダイナミックに捉えることが可能である。これまで、慢性腎臓病における認知機能障害は広く知られていたが、その要因としては専ら、脳血管障害に伴う血管性認知症や尿毒素による脳組織の傷害が考えられてきた。本研究では、これらに加えてトリプトファン代謝という新たな視点を提案し、「脳-腎連関」の理解を進展させるとともに、慢性腎臓病における認知機能障害に対する新規治療法の科学的基盤の構築に寄与すると考える。病態形成のキーとなるトリプトファン代謝経路の変更点が特定できた場合、代謝酵素阻害剤などの薬剤脳内投与による認知機能改善を試みる。

3. 研究の方法

糖尿病性腎症モデルラットを用いて、腎症の発症に至る過程で尿・血液・脳脊髄液の経時的なサンプリングを行い、腎機能(尿・血液)およびトリプトファン代謝物の網羅的解析を行った。併せて、行動試験による認知機能の解析、MRIによる海馬の活動性の解析を経時的に行った。これらは全て同一個体で行った。

- (1) 動物作製：①糖尿病モデルラット (Fat) : 2型糖尿病モデル SDT fatty ラット (日本クレア)。
②糖尿病性腎症モデルラット (Fatx) : Fat ラットを6週齢で片腎摘出し0.3%食塩水の飲水負荷(4週間)を行い、糸球体濾過率 (GFR) の低下 (50%以下) を呈する糖尿病性腎症を発症させた。③SD ラット (SD) : 対照群。④腎摘ラット (SDx) : SD ラットを Fatx と同様に処置した。
- (2) 一次代謝物および尿毒素の測定：側脳室および前頭前野に透析プローブ (Atmos LM、エイコム) を刺入して0.1%BSA/リンゲルを灌流し、覚醒下で透析液 (側脳室：脳脊髄液、前頭前野：脳間質液) を回収した。死後に心採血および脳組織を採取した。サンプルに含まれる一次代謝物および尿毒素を質量分析 (LCMS-8060、島津製作所) により定量した。
- (3) 脈絡叢の透過性の測定：70kDa デキストラン-FITC (TdB Labs) 生理食塩水溶液を0.1g/kg 体重で尾静脈投与し、脳脊髄液および脳間質液の透析サンプルをマイクロダイアリシスで経時的に回収した。
- (4) 行動試験：①オープンフィールド試験：動物を測定箱 (60cm x 60cm) に入れ、30分間における中央および周辺運動と測定した。②明暗選択試験：白・黒2部屋 (30cm x 60cm) の測定箱に動物を入れ、各部屋での運動を10分間測定した。③高架十字迷路試験：床面から高さ60cmの十字迷路に動物を入れ、壁あり通路および壁なし通路の運動を10分間測定した。④ビーズ覆い隠し試験：床敷き入れた飼育ケージ (30cm x 50cm) にビーズ25個を等間隔に置き、動物を入れて10分間の覆い隠し行動を測定した。⑤物体認識試験：オープンフィールド

に物体を2種類入れ、2時間経過後、1つの物体を入れ替え、入れ替わった物体への接触行動の多少から認知知能を評価した。⑥強制水泳試験：動物を水槽へ入れ、10分間の運動量および不動時間を測定した。⑦懸垂試験：動物を金網に掴まらせて反転し、落下までの時間を測定した。

- (5) 組織化学：脳組織を4%パラホルムアルデヒドで浸漬固定し、凍結包埋し薄切した。PV1、 Δ FosB、GFAP、Iba1で免疫染色した。
 (6) マンガン造影MRI：MnCl₂溶液を60mg/kg体重で腹腔投与し、1時間後に脳をMRIで撮影し、シグナル強度を測定した。

4. 研究成果

[研究の主な成果]

- (1) 血清、脳脊髄液 (CSF)、脳間質液 (ISF)、脳組織における物質動態

- ① トリプトファン代謝物：Fat群とFatx群で明瞭な差は予想に反して見られなかった。
 ② 一次代謝物：脳脊髄液ではFatx群でアラニンやアルギニンなどアミノ酸が低下していた(図1)。これはうつ病の血清に見られる特徴である[11]。一方、脳間質液ではFatxでカルニチンやアセチルカルニチンが減少し、S-アデノシルホモシステイン (SAH) が増加していた。これらはアルツハイマー病の血清にて見られる特徴である[12][13]。

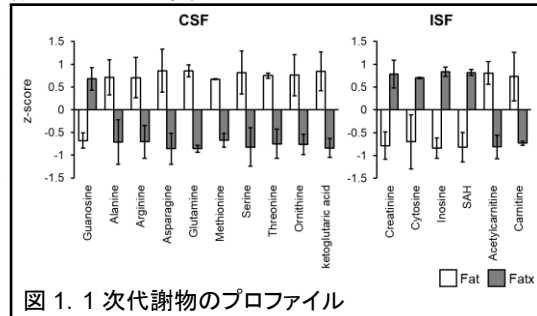


図 1. 1 次代謝物のプロファイル

- ③ 尿素素：脳脊髄液、脳間質液および脳組織中に含まれる尿素素の成分濃度は、馬尿酸やインドキシル硫酸など血液脳関門透過性の尿素素物質は血清同様に Fatx 群の方が Fat 群よりも多く、脳組織への蓄積も多かった。一方、非対称ジメチルアルギニン (ADMA) やプロレリンなど血液脳関門非透過性の尿素素物質についてはこの傾向は異なり、脳組織への蓄積は Fatx 群の方が少なかった (図 2)。

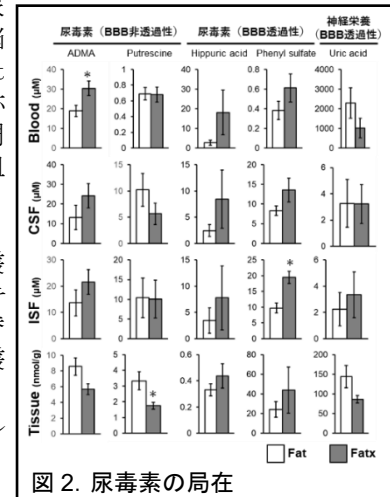


図 2. 尿素素の局在

- (2) 脈絡叢の透過性：脳実質の血液脳関門は通過しないが脈絡叢の血液脳脊髄液関門は透過すると考えられる 70kDa 蛍光デキストランを尾静脈投与し、蛍光の動態を調べた。蛍光の脳脊髄液および脳間質液の移行は Fatx 群の方が少なく、脈絡叢上皮における蛍光強度も Fatx 群の方が少なかった (図 3、4)。このことから、Fatx 群において脈絡叢の透過性が低下していることが示唆された。

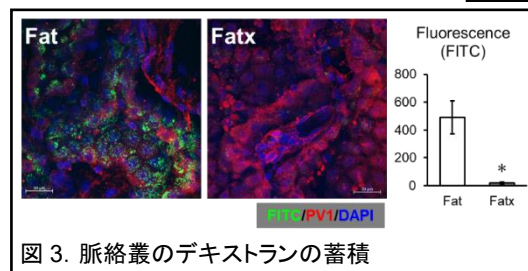


図 3. 脈絡叢のデキストランの蓄積

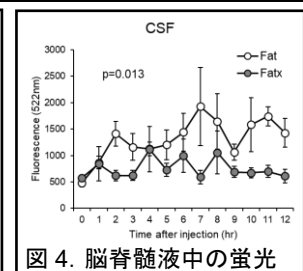


図 4. 脳脊髄液中の蛍光

- (3) 行動解析：オープンフィールド試験、明暗選択試験、高架式十字迷路試験において、Fatx 群では Fat 群よりも不安様行動の増加傾向が見られた。また、強制水泳試験において Fatx 群では Fat 群よりも不安様行動が増加していた (図 5)。

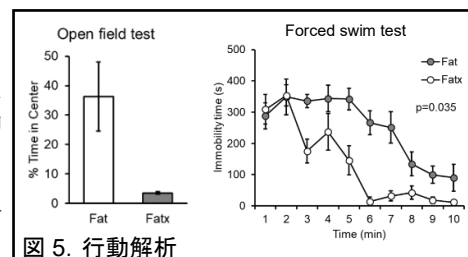


図 5. 行動解析

- (4) 免疫組織化学：神経細胞の累積的な活動の指標である Δ FosB の発現は、Fatx 群では Fat 群よりも前頭前野および海馬腹側において低下していた (図 6)。これは Fatx 群ではストレス抵抗性よりも感受性が増加している可能性を示唆している [14]。

以上より、糖尿病性腎症モデル動物では脈絡叢の透過性が変化 (低下) し、脳組織の液性環境が変化した結果、ストレス感受性が増加し、その表現型として不安様行動やうつ様行動の傾向が見られる可能性が示唆された。

〔得られた成果の国内外における位置づけとインパクト〕

本研究は脳腎連関の理解の伸展に寄与した。これまで、腎機能障害における脳機能障害は、専ら血管障害や尿毒素の蓄積による認知機能障害として理解されてきた[15]。本研究において、ストレス感受性とそれに伴う不安障害やうつ障害へと関連性を拡張することができた。また、その背景として血液脳関門ではなく血液脳脊髄液関門の透過性の低下が関与することが示唆された。脈絡叢の透過性については、腸炎の際に腸内細菌叢由来の炎症物質が脳内に侵入するのを阻止するために透過性が低下し、それに伴って認知機能の低下が起こることが報告されている[16]。これと同様に糖尿病性腎症においても、血液尿関門非透過性の尿毒素が血液中から脳組織へ移行するのを阻止するために脈絡叢がシャットダウンを起こし、その結果として脳機能が阻害される可能性がある。脳腎連関における要素として脈絡叢の機能を見出したことは新規である。

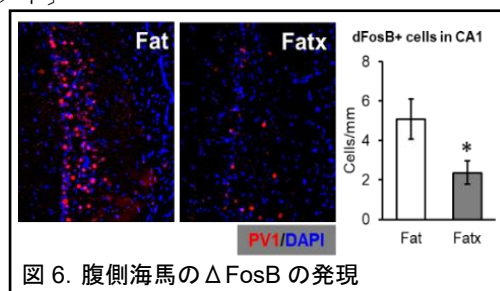


図 6. 腹側海馬の Δ FosB の発現

〔今後の展望〕

血液脳関門非透過性で脈絡叢透過性の血中物質を同定し、血中濃度をモニタリングすることにより、糖尿病性腎症に付随する不安障害・うつ障害のリスク予測ができる可能性がある。また、これらの物質を標的とした脳機能改善の治療法開発につながる可能性がある。

<引用文献>

- [1] Pereira AA et al. Cognitive function in dialysis patients. *Am J Kidney Dis.*, 2017, 45:448-462.
- [2] 高江啓太ら. 一般住民におけるアルブミン尿と認知症発症の関係:久山町研究. *日本腎臓学会誌* 2016, 58:263.
- [3] 高橋智. 認知症のBPSD. *日本老年医学会雑誌* 2011, 48:195-204.
- [4] Hirayama A et al. Metabolic profiling reveals new serum biomarkers for differentiating diabetic nephropathy. *Anal Bioanal Chem.*, 2012, 404:3101-9.
- [5] Matsuoka K et al. Concentrations of various tryptophan metabolites are higher in patients with diabetes mellitus than in healthy aged male adults. *Diabetol Int.*, 2017, 8:69-75.
- [6] Chou CA et al. Tryptophan as a surrogate prognostic marker for diabetic nephropathy. *J Diabetes Investig.*, 2018, 9:366-374.
- [7] Erhardt S et al. The kynurenic acid hypothesis of schizophrenia. *Physiol Behav.*, 2007, 92:203-209.
- [8] Bonda D et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase and 3-hydroxykynurenine modifications are found in the neuropathology of Alzheimer's disease. *Redox Rep.*, 2011, 15:161-168.
- [9] Steiner J et al. Severe depression is associated with increased microglial quinolinic acid in subregions of the anterior cingulate gyrus: evidence for an immune-modulated glutamatergic neurotransmission?. *J Neuroinflammation.* 2011, 8:94.
- [10] Heisler JM et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent neurotoxic kynurenine metabolism mediates inflammation-induced deficit in recognition memory. *Brain Behav Immun.*, 2015, 50:115-124.
- [11] Pu J et al. An integrated meta-analysis of peripheral blood metabolites and biological functions in major depressive disorder. *Mol Psychiatry.*, 2021, 26:4265-4276.
- [12] Kepka A et al. Preventive role of L-carnitine and balanced diet in Alzheimer's disease. *Nutrients*, 2020, 3:1987.
- [13] Kennedy BP et al. Elevated S-adenosylhomocysteine in Alzheimer's brain: influence on methyltransferases and cognitive function. *J Neural Transm (Vienna).*, 2004, 111:547-67.
- [14] Eagle AL et al. Circuit-specific hippocampal Δ FosB underlies resilience to stress-induced social avoidance. *Nat Commun.*, 2020, 11:4484.
- [15] Viggiano D et al. Mechanisms of cognitive dysfunction in CKD. *Nat Rev Nephrol.*, 2020, 16:452-469.
- [16] Carloni S et al. Identification of a choroid plexus vascular barrier closing during intestinal inflammation. *Science*, 2021, 374:439-448.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Maeda Masao, Usuda Nobuteru, Kokubo Masahiro, Shirane Sumito, Fukasawa Motoaki, Nagayama Kuniaki	4. 巻 28
2. 論文標題 A Leeuwenhoek-Type Mobile Microscope for Histology Education	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microscopy Today	6. 最初と最後の頁 54 ~ 59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1017/S155192952000108X	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Harada Shohei, Takano Kazuki, Fukasawa Motoaki, Shirakawa Seiji, Yamada Masayuki	4. 巻 94
2. 論文標題 Manganese-enhanced magnetic resonance imaging detects activation of limbic structures in response to auditory stimuli of different frequencies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Magnetic Resonance Imaging	6. 最初と最後の頁 89 ~ 97
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mri.2022.08.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Johkura Kohei, Usuda Nobuteru, Tanaka Yoshihiro, Fukasawa Motoaki, Murata Kazuyoshi, Noda Toru, Ohno Nobuhiko	4. 巻 71
2. 論文標題 Whole-cell observation of Z10-stained Golgi apparatus in rat hepatocytes with serial block-face scanning electron microscope, SBF-SEM	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 262 ~ 270
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jmicro/dfac024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深澤元晶、高野一輝、長尾静子、高橋 和男
2. 発表標題 糖尿病性腎症モデル動物における脳機能の解析
3. 学会等名 第53回藤田医科大学医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深澤元晶、高野一輝、長尾静子、高橋 和男
2. 発表標題 糖尿病性腎症モデルラットにおける側脳室微小環境と脳機能の関連についての検討
3. 学会等名 第54回藤田医科大学医学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長尾 静子 (Nagao Shizuko) (20183527)	藤田医科大学・病態モデル先端医学研究センター・教授 (33916)	
研究分担者	山田 雅之 (Yamada Masayuki) (40383773)	藤田医科大学・保健学研究科・教授 (33916)	
研究分担者	高橋 和男 (Takahashi Kazuo) (90631391)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------